



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12Q 1/68, C12N 9/08, C07K 14/245		A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/55908 (43) Date de publication internationale: 4 novembre 1999 (04.11.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01000</p> <p>(22) Date de dépôt international: 27 avril 1999 (27.04.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/05329 28 avril 1998 (28.04.98) FR <i>28 Oct 00 Bmns</i></p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS [FR/FR]; 3, boulevard Raymond Poincaré, F-92430 Marnes la Coquette (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): FRECHON, Dominique, Thérèse, Marie [FR/FR]; 22, avenue de Saint Ouen, F-75018 Paris (FR). LAURE, Françoise, Claudine [FR/FR]; 6, rue des Coulronnes, F-75020 Paris (FR). THIERRY, Dominique [FR/FR]; 4, rue des Longs Prés, F-92100 Boulogne (FR).</p> <p>(74) Mandataire: OBOLENSKY, Michel; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p>	

(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES FOR DETECTING ENTEROHEMORRHAGIC *ESCHERICHIA COLI* (EHEC)(54) Titre: SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES POUR LA DETECTION DES *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRAGIQUES (EHEC)

(57) Abstract

The invention concerns nucleic sequences of plasmid origin, present in bacteria of the group enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), the use of said sequences for searching for EHEC, in particular those having genes coding for enterohemolysin and intimin virulence factors, and more particularly for specific detection of the O157:H7 serotype. The invention also concerns a method using said sequences and detection kits containing them.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet des séquences nucléiques d'origine plasmidique, présentes chez les bactéries du groupe *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC), l'utilisation desdites séquences pour la recherche des EHEC, notamment ceux possédant les gènes codant pour les facteurs de virulence entérohémolysine et intimine, et plus particulièrement la détection spécifique du sérotype O157:H7. L'invention vise également un procédé mettant en oeuvre lesdites séquences ainsi que les trousseaux de détection les contenant.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

- 1 -

Séquences nucléotidiques pour la détection des *Escherichia Coli* entérohémorragiques (EHEC).

L'invention a pour objet deux séquences nucléiques d'origine plasmidique, présentes chez les bactéries du groupe *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC), l'utilisation desdites séquences pour la recherche des EHEC, notamment ceux possédant les gènes codant pour les facteurs de virulence, entérohémolysine et intimine, et plus particulièrement la détection spécifique du sérotype O157 :H7. L'invention vise également un procédé mettant en œuvre lesdites séquences ainsi que les trousse de détection les contenant.

Les bactéries du groupe EHEC appartiennent à la famille des *Escherichia coli* producteurs de vérotoxines ou VTEC, responsables de syndromes diarrhéiques dont les conséquences peuvent être fatales chez l'homme. En particulier, les EHEC peuvent engendrer des colites hémorragiques (CH), et éventuellement l'apparition de complications majeures comme le syndrome hémolytique et urémique (SHU) ou le purpura thrombotique thrombopénique (Griffin et Tauxe, *Epidemiol. Rev.* 13, 1991, 60-98).

Aussi, l'incidence de ces infections sur la santé publique est telle, qu'elle implique un contrôle accru des denrées alimentaires et des moyens de détections rapides, notamment en cas d'épidémies.

20

Plusieurs sérotypes, appartenant au groupe EHEC ont été identifiés et rendus responsables de différents foyers épidémiques : O157 :H7, O26 :H11, O111 :NM, O103 :H2, O145 :NM etc (Acheson et Keush, *ASM News* 62, 1996, 302-306). Cependant, c'est le sérotype O157 :H7 qui a été le plus fréquemment isolé.

30

Les méthodes de détection traditionnelles consistent à identifier les bactéries ou à déceler les toxines sécrétées par celles-ci. La détection de *E. coli* O157 :H7 est principalement réalisée sur la base du sérotypage, associé à la recherche de propriétés métaboliques, comprenant l'absence de fermentation du sorbitol et/ou l'absence d'activité β -glucuronidase. Il n'existe pas, par ailleurs, de méthode bactériologique propre à la détection des EHEC, mais des tests permettant d'orienter le diagnostic. En particulier, l'utilisation de géloses

supplémentées avec du sang ou des hématies lavées permet de mettre en évidence le caractère entérohémolytique, généralement présent chez les EHEC.

5 De manière générale, les méthodes bactériologiques et immunologiques relatives à la détection de *E. coli* O157 :H7 sont longues, fastidieuses, relativement coûteuses et nécessitent une confirmation sérologique. Par ailleurs, ces méthodes ne permettent pas d'établir une identification de *E. coli* O157 :H7 du fait des réactions croisées avec d'autres genres et espèces bactériens, ce qui rend l'interprétation difficile.

10

L'utilisation de sondes nucléiques est donc apparue comme une alternative à ces méthodes traditionnelles. Des efforts importants ont été réalisés pour développer des sondes, capables de détecter d'une manière sensible et spécifique les bactéries *E. coli* de type EHEC, impliquées dans les cas de CH 15 et/ou SHU, et dont le prototype le plus répandu est *E. coli* O157 :H7.

20 En particulier, des sondes ou fragments, permettant la détection des gènes responsables de la virulence des *E. coli*, encore appelés facteurs de virulence, ont été publiés. Toutefois, aucun des facteurs de virulence actuellement connu ne permet à lui seul d'identifier des souches pathogènes de *E. coli* O157 :H7 ou des EHEC.

Ainsi, l'utilisation de sondes ou fragments nucléiques pour la détection des 25 gènes codant pour les vérotoxines (vt1 ou st1, vt2 ou st2), décrite par de nombreux groupes de recherche (Karch et Meyer, *J. Clin. Microbiol.* 27, 1989, 2751-2757 ; Gannon et al. , *Appl. Env. Microbiol.* 58, 1992, 3809-3815 ; Begum et al., *J. Clin. Microbiol.* 31, 1993, 3153-3156 ; Witham et al., *Appl. Env. Microbiol.* 62, 1996, 1347-1353), a montré que les gènes codant pour les vérotoxines sont associés aux souches bactériennes pathogènes *E. coli* 30 O157 :H7 et autres EHEC, mais peuvent aussi être présents chez des souches *E. coli* non pathogènes, ou éventuellement chez d'autres genres bactériens comme *Shigella dysenteriae*, *Citrobacter freundii*, etc.

De même, la protéine d'adhésion dénommée intimine est également impliquée dans la virulence des bactéries de type EHEC. Des sondes ont été notamment sélectionnées sur le gène correspondant (*eae*) par Gannon *et al.* dans *J. Clin. Microbiol.* 31, 1993, 1268-1274, Louie *et al.* dans *Epidemiol. Infect.* 112, 1994, 449-461 et Meng *et al.* dans *Int. J. Food Microbiol.* 32, 1996, 103-113. Cependant, bien que ce facteur de virulence soit étroitement associé au groupe des EHEC, il est également rencontré chez les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) comprenant le sérotype O55 :H7.

Enfin, des sondes ont été sélectionnées sur un plasmide de 60 MDa, codant entre autres pour l'entérohémolysine, facteur de virulence également présent chez de nombreux EHEC (*Levine et al.*, *J. Infect. Dis.* 156, 1987, 175-182 ; *Schmidt et al.*, *Infect. Immun.* 63, 1995, 1055-1061). Ainsi, le brevet US 5,475,098 vise les séquences nucléiques contenues dans l'opéron de l'entérohémolysine, correspondant aux gènes *hlyA*, *hlyB* et à la région intergénique *hlyA-hlyB*. Les séquences oligonucléotidiques revendiquées permettent une détection spécifique des EHEC, mais l'invention ne permet pas de différencier *E. coli* O157 :H7 des autres EHEC. Par ailleurs, le brevet US 5,652,102, décrit une séquence nucléique située sur un fragment de restriction issu du plasmide de 60 MDa. Cependant, l'utilisation d'oligonucléotides dérivés de cette séquence dans une réaction de polymérase en chaîne ou "Polymerase Chain Reaction" (PCR), ne permet pas à elle seule l'identification spécifique du sérotype O157 :H7, et nécessite par conséquent l'utilisation conjointe d'amorces amplifiant les gènes codant pour les vérotoxines et l'intimine.

Le plasmide p0157, isolé d'une souche *E. coli* 0157:H7 provenant d'un échantillon clinique, a dernièrement été décrit dans sa totalité (*Makino et al.*, *DNA Research* 5, 1998, 1-9). Une cartographie du plasmide représentant l'ordonnancement des différents gènes sur le génome du plasmide indique la présence de 186 phases ouvertes de lecture (ORF). Toutefois, l'absence de données de la séquence nucléique (données non disponibles au moment de la parution de l'article), ne permet en aucun cas d'identifier une région d'intérêt diagnostique pour la détection spécifique de *E. coli* 0157:H7.

Dernièrement, la demande de brevet WO 97/32045 vise des oligonucléotides sélectionnés à partir d'une séquence chromosomique obtenue

par la méthode RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), conduisant à la détection d'environ 99,5 % de *E. coli* O157 :H7, mais les séquences nucléiques revendiquées détectent également près de 3 % de *E. coli* non EHEC, ce qui n'est pas satisfaisant en terme de spécificité, notamment dans le domaine de l'agro-alimentaire.

L'inconvénient majeur de tous ces systèmes de détection réside donc dans le fait qu'aucun d'entre eux, ne permet d'établir clairement et simplement l'identification du sérotype *E. coli* O157 :H7. Il est en effet très souvent nécessaire d'associer plusieurs systèmes d'amplification et/ou de détection pour rendre le résultat précis. Les protocoles utilisés sont alors difficiles à mettre en œuvre (amplifications multiples, simultanées) et les résultats obtenus quant à la sensibilité et à la spécificité sont fortement dépendants, non seulement des cibles nucléiques utilisées, mais aussi des conditions opératoires.

15

Or, comme il a été précédemment indiqué, ce sérotype peut provoquer de graves syndromes pouvant conduire à la mort, ce qui implique des moyens rapides et fiables de détection, notamment en cas d'épidémie.

20

Les travaux des inventeurs ont consisté à rechercher des séquences spécifiques à partir d'une banque génomique de *E. coli* O157 :H7, permettant la reconnaissance des principaux sérotypes de *E. coli* pathogènes pour l'homme, et plus particulièrement O157 :H7. La banque a été criblée contre *E. coli* entéropathogène O55 :H7, ancêtre supposé du sérotype O157 :H7, les deux génomes étant extrêmement proches d'après les analyses de polymorphisme réalisées par T. Whittam *et al.* dans *Infect. Immun.* 61, 1993, 1619-1629.

25

Ces travaux ont permis d'isoler deux fragments nucléiques d'intérêt pour la détection des EHEC et plus particulièrement pour la détection de *E. coli* O157 :H7, comprenant les séquences nucléiques SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2, situées sur le plasmide entérohémolytique de 60 MDa. Les clones correspondants pDF3 et pDF4 contenant ces séquences ont été déposés auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur, respectivement sous les numéros I-1999 et I-2000, le 26 mars 1998.

D'une façon surprenante, il a été mis en évidence une première séquence (SEQ ID N°1) comprenant l'association stable d'une partie de la séquence d'insertion IS91 et de la séquence issue du gène *katP* de *E. coli* O157 :H7 ou d'une partie de celle-ci, l'enchaînement nucléique en résultant, jamais décrit par ailleurs, étant spécifiquement retrouvé chez *E. coli* O157 :H7.

Le gène *katP*, codant pour une catalase-péroxydase, est présent sur le plasmide entérohémolytique de *E. coli* O157 :H7 et de nombreuses EHEC (Brunder et al., *Microbiol.* 142, 1996, 3305-3315), et la séquence d'insertion IS91, identifiée sur les plasmides α -hémolytiques de *E. coli* (Zabala et al., *J. Bacteriol.* 151, 1982, 472-476), n'a encore jamais été décrite chez les souches entérohémolytiques de type *E. coli* O157 :H7.

La mise en évidence d'une séquence d'insertion tronquée au niveau de la jonction IS91-*katP* (absence de la séquence inversée répétée gauche (IR_L) de l'IS91) suggère aussi une intégration stable de l'IS91 dans cette partie du génome de *E. coli* O157 :H7.

L'analyse des produits amplifiés d'un grand nombre de souches O157 :H7 d'origines diverses démontre la conservation de cet enchaînement nucléotidique au sein du sérotype O157 :H7.

En effet, un produit amplifié de 670 paires de bases a été observé chez toutes les souches testées (55 *E. coli* O157 :H7 et 1 *E. coli* O157 :H-) avec les amorces SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4, situées respectivement dans les séquences IS91 et *katP*.

Par ailleurs, les données obtenues à partir des profils de restriction *Alu*I et *Rsa*I effectués sur les produits amplifiés de 5 souches O157 :H7 d'origines différentes, ainsi que l'analyse de séquence réalisée chez 3 souches, dont 2 isolées d'épidémies (USA, 1993 et Japon, 1996) ont montré une parfaite conservation c'est à dire 100 % d'homologie dans la partie de séquence analysée (SEQ ID N° 1 : positions (nt) 272 à 624).

De plus, l'enchaînement nucléotidique, stable et conservé, est probablement un événement de recombinaison relativement ancien, survenu chez *E. coli* O157 :H7 au cours de l'évolution, puisque des souches isolées en des lieux et des époques différents présentent cette même caractéristique.

Cette séquence représente donc une cible de choix pour la détection spécifique du sérotype O157 :H7.

Une seconde séquence a été caractérisée (SEQ ID N°2) sur le même plasmide, associée à la présence des facteurs de virulence entérohémolysine (*ehly*) et intimine (*eae*), caractères propres aux souches de *E. coli* entérohémorragiques, comprenant le sérotype O157 :H7. A ce titre, ce fragment présente un intérêt épidémiologique, car, à la différence des procédés déjà connus, nécessitant la mise en œuvre de plusieurs systèmes moléculaires (Paton et Paton, *J. Clin. Microbiol.* 36, 1998, 598-602), l'utilisation de cette séquence pour une application diagnostique donne lieu à une mise en œuvre simplifiée et à une interprétation plus rapide des résultats.

La présente invention a donc pour objet les séquences nucléiques SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2, leurs séquences complémentaires, les séquences dérivées de celles-ci et les fragments utilisables pour la détection spécifique des EHEC, dans un échantillon alimentaire, clinique ou vétérinaire, ou de l'environnement.

La présente invention a plus particulièrement pour objet une séquence spécifique pour la détection du sérotype *E. coli* O157 :H7, comprenant la séquence SEQ ID N°1, un fragment de cette séquence ou une séquence dérivée de celle-ci.

Selon l'invention, la séquence SEQ ID N°1 comprend un enchaînement nucléotidique résultant d'un événement de recombinaison stable entre la séquence du gène *katP* ou une partie de celle-ci et une séquence d'insertion IS91 tronquée.

Selon la présente invention, on entend par séquence nucléique aussi bien la séquence d'ADN ou d'ADN complémentaire (ADNc), ou encore la séquence d'ARN correspondante.

5 L'invention concerne aussi des séquences nucléiques dérivées de la SEQ ID N°1 ou la SEQ ID N°2, c'est à dire des séquences différant par mutation, insertion, délétion et/ou substitution d'une ou plusieurs bases mais s'hybridant néanmoins, dans des conditions de forte stringence, avec l'une des susdites séquences.

10

Selon l'invention, on entend par forte stringence des conditions de température et de force ionique telles qu'elles permettent une hybridation spécifique entre deux fragments d'acides nucléiques complémentaires et limitent les fixations aspécifiques (*Sambrook et al. , Molecular Cloning, Second Edition* 15 (1989), 9.47-9.62). Les conditions de température sont généralement comprises entre (T_m moins 5°C) et (T_m moins 10°C) lorsque l'une des séquences de l'hybride est courte (une vingtaine de nucléotides), T_m étant la température théorique de fusion, définie comme étant la température à laquelle 50 % des brins appariés se séparent.

20

On entend également selon l'invention, par séquence nucléique dérivée de la SEQ ID N° 1, toute séquence différant de celle-ci par mutation, insertion, délétion et/ou substitution d'une ou plusieurs bases et comportant un enchaînement de recombinaison stable entre le gène *katP* et la séquence 25 d'insertion IS91 tronquée.

Plus particulièrement, les séquences nucléiques contiennent au moins 8 nucléotides, préférentiellement 10 nucléotides, ou très préférentiellement 14 nucléotides consécutifs de l'enchaînement de la Figure 1, et comprennent les 30 nucléotides de la position 400 à la position 407.

La présente invention a également pour objet une seconde séquence, spécifique des EHEC, qui est la SEQ ID N°2, les séquences complémentaires de celles-ci, les fragments de celles-ci et les séquences dérivées de celles-ci, ces

séquences étant toujours détectées chez les EHEC, notamment chez les EHEC possédant conjointement les gènes codant pour l'entérohémolysine (*ehly*) et l'intimine (*eae*) ; ladite séquence SEQ ID N° 2 étant représentée à la Figure 2.

5 L'invention se rapporte également à des fragments oligonucléotidiques, issus des séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2, utilisables comme amorces dans un processus d'amplification ou comme sonde dans le cadre de la mise en œuvre d'un procédé de détection, comprenant au moins 8, avantageusement au moins 10, plus avantageusement 14 nucléotides, et de préférence jusqu'à 30
10 nucléotides consécutifs de l'enchaînement nucléotidique de SEQ ID N°1 ou de SEQ ID N°2, lesdites amorces étant susceptibles de s'hybrider aux dites séquences dans des conditions de forte stringence, telles que définies ci-dessus.

15 Les amorces ou sondes de l'invention comprennent également des oligonucléotides pouvant être modifiés par substitution et/ou addition et/ou suppression de plusieurs nucléotides, ou par l'addition à l'une des extrémités (généralement en 5' pour les amorces ; 3' ou 5' pour les sondes) d'une séquence nucléique étrangère à la séquence recherchée, ou encore d'une molécule de
20 marquage, lesdits oligonucléotides étant néanmoins capables de s'hybrider dans des conditions de forte stringence avec des séquences nucléiques complémentaires présentes chez *E. coli* O157 :H7 ou chez les EHEC.

25 Selon un mode préféré de l'invention, les oligonucléotides peuvent être utilisés comme amorces, dans un processus d'amplification génique, conduisant à l'obtention d'une quantité importante de copies d'un fragment de SEQ ID N° 1 ou d'un fragment de SEQ ID N° 2 et permettant respectivement, la détection spécifique de *E. coli* O157 :H7 ou des EHEC.

30 L'étape d'amplification peut être réalisée par toute méthode utilisant les techniques classiques d'amplification enzymatique de l'ADN ou de l'ARN, telles que notamment, la technique TAS (Transcription-based Amplification System) proposée par Kwok et al. dans *PNAS*, 86, 1989, 1173-1177, la technique 3SR (Self-Sustained Sequences Replication) décrite par Fahy et al. dans *PCR Meth. Appl.* 1, 1991, 25-33, la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based

Amplification) décrite dans le brevet EP 329 822, ou encore la technique SDA (Strand Displacement Amplification) décrite par Walker *et al.* dans *P.N.A.S.* 89, 1992, 392-396, ou avantageusement la technique PCR telle que décrite notamment dans les brevets Européens, EP 200 362 et EP 201 184, délivrés au nom de Cetus, ou encore les techniques dérivées de ces dernières et toute méthode visant à amplifier *in vitro* les séquences nucléiques.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, les oligonucléotides issus des séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2 sont utilisés en PCR.

10

La détection des produits amplifiés peut être réalisée par électrophorèse sur gel de tout ou partie du milieu réactionnel dans lequel l'amplification a été effectuée, notamment sur gel d'agarose ou de polyacrylamide, ou par électrophorèse capillaire ou par chromatographie. La visualisation d'une bande de fragments nucléiques localisée en un point spécifique du gel permet d'en apprécier la taille, l'intensité de cette bande pouvant être corrélée grossièrement au nombre de copies initiales de la cible à détecter dans l'échantillon.

20

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les oligonucléotides, tels que définis ci-dessus, peuvent être utilisés comme sondes dans un processus d'hybridation pour la détection directe d'une séquence nucléique cible ou après amplification pour la détection des produits amplifiés.

25

A titre d'illustration, les fragments nucléotidiques peuvent être marqués par un élément radioactif (par exemple ^{32}P , ^{35}S , ^{3}H , ^{125}I) ou par une molécule non radioactive notamment biotine, acétylaminofluorène, fluorochrome, digoxigénine, ou par une molécule enzymatique, ou un haptène. Des exemples de marquages non radioactifs de sondes sont décrits, par exemple, dans le brevet français de *P. Kourilsky n° 78.10975*, ou par *M.S. Urdea et al., Nucleic Acids Symp. Ser.*, 24, 1991, 197-200, ou encore par *R. Sanchez-Pescador, J. Clin. Microbiol.* 26, 1988, 1934-1938.

La méthode d'hybridation la plus générale consiste à immobiliser l'acide nucléique extrait de l'échantillon à analyser sur un support (nitro-cellulose, nylon,

polystyrène, etc.) et à incuber dans des conditions définies de température et de force ionique, l'acide nucléique immobilisé avec la sonde. Après hybridation, l'excès de sonde est éliminé et les molécules hybrides formées sont détectées par la méthode appropriée (mesure de la radioactivité, de la fluorescence ou de l'activité enzymatique liée à la sonde).

Les molécules hybrides formées peuvent également être détectées sans qu'il soit nécessaire de séparer les phases « liée » et « non liée ». On dit alors que la détection s'effectue en phase homogène. Ces méthodes, telles que décrites par T. Walker *et al. Clin. Chemistry* 42, 1996, 9-13 et L. Morrison (*Nonisotopic DNA Probe Techniques*, Academic Press, 1992, 312-352) concernent notamment la polarisation de fluorescence, dans laquelle une sonde est marquée à la fluoresceine et où l'hybridation entraîne une modification de la fluorescence, ou encore le transfert d'énergie. Dans ce dernier cas, la détection repose sur des interactions inter ou intramoléculaires entre deux marqueurs. Un premier marqueur appelé « donneur » est excité par absorption d'une lumière à une longueur d'onde particulière. L'énergie est transférée à un second marqueur appelé « accepteur », qui est à son tour excité et émet de l'énergie.

Les sondes oligonucléotidiques peuvent également être mises en œuvre au sein d'un dispositif de détection comprenant un arrangement matriciel d'oligonucléotides dans lequel, des oligonucléotides d'une longueur donnée, sont fixés dans un ordre prédéterminé sur un support et se chevauchent les uns par rapport aux autres d'une ou plusieurs bases ; chaque oligonucléotide étant complémentaire d'une séquence d'ADN ou d'ARN de la séquence cible à déetecter. La séquence cible, avantageusement marquée est mise en contact avec le dispositif matriciel et peut s'hybrider aux sondes fixées sur le support. Un traitement enzymatique permet ensuite d'éliminer les hybrides incomplets. Connaissant la séquence d'une sonde à une position déterminée de la matrice, il est ainsi possible de déduire la séquence nucléotidique de la séquence cible analysée et de déduire les mutations éventuellement survenues.

Une alternative à l'utilisation d'une séquence marquée peut consister en l'utilisation d'un support permettant une détection « bioélectronique » de

l'hybridation de la séquence cible sur les sondes fixées sur le support d'un matériau, tel que l'or, capable d'agir, par exemple, en tant que donneur d'électrons aux positions de la matrice auxquelles un hybride est formé. La détection de la séquence nucléique cible est alors déterminée par un dispositif électronique. Un exemple de réalisation d'un biocapteur est décrit dans la demande de brevet EP-0721 016 au nom d'Affymax Technologies.

Selon un mode simple et avantageux de mise en œuvre, les sondes nucléiques peuvent être utilisées comme sondes de capture. Dans ce cas, la 10 sonde dite « sonde de capture » est immobilisée sur un support et sert à capturer par hybridation spécifique l'acide nucléique cible à partir de l'échantillon à tester. Si nécessaire, le support solide est séparé de l'échantillon et le duplex formé entre la sonde de capture et la séquence d'acide nucléique cible est ensuite 15 détecté grâce à une seconde sonde dite « sonde de détection », marquée par un élément détectable. Avantageusement, les sondes de capture et de détection sont complémentaires de deux régions différentes comprises dans la séquence cible (amplifiée ou non) à détecter.

La fixation de la sonde de capture sur le support solide peut se faire selon 20 des procédés bien connus de l'homme du métier, notamment par adsorption passive ou par couplage covalent (*Cook et al., Nucleic Acids Res. 16, 1988, 4077-4095 ; Nagata et al., FEBS Lett. 183, 1985, 379-382 ; M. Longlaru et al., EP 420 260 A2 ; T. Gingeras et al., EP 276 302 ; E. Hornes et LM. Kornes, EP 446 260*).

25

L'hybridation des sondes de capture et de détection peut se faire séparément (en deux temps) ou simultanément (en un temps), notamment selon l'une des méthodes décrites par Langhale et Malcolm, *Gene 36, 1985, 201-210* ou par Ranki et al, *Gene 21, 1993, 77-85*, par Dunn et Hassel, *Cell, 12, 1977, 23-36* ou encore par Ranki et Soderlund dans les brevets US 4,486,539 et 30 US 4,563,419.

La présente demande a donc également pour objet des oligonucléotides issus de SEQ ID N°1 ou de SEQ ID N°2, sélectionnés comme amorces ou

comme sondes, susceptibles de s'hybrider dans des conditions stringentes avec une séquence d'acide nucléique cible contenue dans l'échantillon testé, spécifiques de *E. coli* O157 :H7 ou des EHEC.

5 On entend par séquence nucléique cible, toute molécule d'ADN ou ADNc ou d'ARN capable de s'hybrider dans des conditions de forte stringence avec un oligonucléotide selon l'invention.

10 Les oligonucléotides préférés dont les séquences sont spécifiées en annexe correspondent aux positions sur les séquences SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2 rapportées dans le tableau ci-après :

	Séquence	Position dans SEQ ID N°1
15	SEQ ID N°3 :	9 - 30
	SEQ ID N°4 :	679 - 658
	SEQ ID N°5 :	6 - 30
	SEQ ID N°6 :	682 - 658
	SEQ ID N°7 :	241 - 263
20	SEQ ID N°8 :	47 - 69
	SEQ ID N°9 :	251 - 274
	SEQ ID N°10 :	426 - 401
	SEQ ID N°11 :	427 - 402
	SEQ ID N°12 :	391 - 421
25	SEQ ID N°13 :	387 - 417
	SEQ ID N°14 :	291 - 321
	SEQ ID N°15 :	510 - 540
	SEQ ID N°16 :	331 - 350
	SEQ ID N°17 :	68 - 87
30	SEQ ID N°18 :	397 - 410
	SEQ ID N°19 :	396 - 411
	SEQ ID N°20 :	395 - 412

SEQ ID N°2

SEQ ID N°21 :	718 - 739
SEQ ID N°22 :	1099 - 1078
SEQ ID N°23 :	41 - 60
SEQ ID N°24 :	884 - 863
SEQ ID N°25 :	928 - 958
SEQ ID N°26 :	970 - 1000
SEQ ID N°27 :	883 - 903

10

L'invention concerne aussi des couples d'oligonucléotides, tels que décrits précédemment, susceptibles d'être utilisés comme amorces pour l'amplification d'une séquence nucléique cible correspondant à SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2, contenue dans le génome de *E. coli* O157 :H7 ou des EHEC :

15

Les couples d'amorces préférées sont les suivants :

- pour l'amplification de *E. coli* O157 :H7 :
 - SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 4
 - SEQ ID N° 5 et SEQ ID N° 6
 - SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 7
 - SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 8
 - SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 9
- pour l'amplification des EHEC :
 - SEQ ID N° 21 et SEQ ID N° 22
 - SEQ ID N° 23 et SEQ ID N° 24

25

Ainsi, l'utilisation du couple d'amorces SEQ ID N°5 et SEQ ID N°6 pour réaliser l'amplification de l'acide nucléique de *E. coli* O157 :H7 conduit à l'amplification d'un fragment nucléique de 676 pb, caractéristique des souches de *E. coli* O157 :H7. La spécificité de ce fragment peut être éventuellement contrôlée par l'utilisation de la sonde SEQ ID N° 18.

De même, l'utilisation du couple d'amorces SEQ ID N° 21 et SEQ ID N° 22 amplifie spécifiquement une séquence nucléique de 382 pb, présente chez les EHEC, possédant aussi les caractères entérohémolysine et

intimine. Les bactéries appartenant aux autres groupes de *E. coli*, comme les ETEC (*E. coli* producteurs d'entérotoxines), les EPEC etc, ne sont pas détectées. La spécificité du produit amplifié peut être par ailleurs confirmée à l'aide de sondes oligonucléotidiques internes au fragment amplifié, telles que SEQ ID N°27.

La présente invention a également pour objet des oligonucléotides, tels que précédemment décrits, susceptibles d'être utilisés comme sondes pour la détection d'une séquence de nucléotides, éventuellement amplifiée. Par exemple, les séquences oligonucléotidiques SEQ ID N° 14, SEQ ID N°15 et SEQ ID N° 18 peuvent être utilisées pour la détection spécifique de *E. coli* O157 :H7. De même, l'utilisation des séquences SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26 et SEQ ID N° 27 permet la détection des EHEC dont O157:H7.

L'invention a également pour objet les plasmides contenant les séquences SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2 mentionnées précédemment ainsi que les cellules hôtes les contenant.

L'invention vise aussi un procédé pour la détection *in vitro* de *E. coli* O157 :H7 ou des EHEC dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

1. la mise en contact de l'échantillon avec l'un des couples d'amorces, tels que décrits ci-dessus, l'acide nucléique contenu dans l'échantillon ayant été, le cas échéant, rendu accessible à l'hybridation des amorces à l'acide nucléique de la cible recherchée,
2. l'amplification de la séquence nucléique encadrée par le couple d'amorces choisi,
3. la vérification de la présence éventuelle du produit amplifié pouvant s'effectuer selon une méthode connue de l'homme du métier, telle que précédemment décrite.

30

Selon un mode de réalisation avantageux, les fragments amplifiés peuvent être détectés selon le principe de la méthode dite « sandwich ».

Entre également dans le cadre de l'invention, un procédé pour la détection *in vitro* de séquences nucléotidiques spécifiques de *E. coli* O157 :H7 ou des EHEC, préalablement amplifiées par détection sur un support, par exemple une plaque de micro-titration et, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- dénaturation de la séquence amplifiée de *E. coli* O157 :H7 et/ou des EHEC par un moyen physique ou chimique. On préférera l'addition d'une solution dénaturante composée de 200 mM NaOH, 40 mM EDTA,

10 - mise en contact, dans un tampon d'hybridation approprié des fragments amplifiés dénaturés avec, d'une part au moins une sonde de capture fixée sur le support, et d'autre part, au moins une sonde nucléique de détection libre dans le tampon d'hybridation, éventuellement marquée, susceptible de s'hybrider avec le même brin des fragments amplifiés que celui avec lequel la sonde de capture est hybridée, mais en une région distincte de celle hybridée avec la sonde de capture ; ladite solution d'hybridation pouvant être avantageusement SSPE (Sodium Saline Phosphate EDTA ; Molecular Cloning, A practical guide, Sambrook et al., Vol.3, 1989, annexe B13) 5 fois concentré, 0,5% Tween 20, Merthiolate 0,01 % ,

20 - incubation du mélange réactionnel pendant une période suffisamment longue pour permettre l'hybridation ; cette incubation pouvant être, par exemple, avantageusement accomplie à 37°C pendant environ 1 heure,

25 - un ou plusieurs lavage(s) du mélange précédent, afin d'éliminer toute séquence nucléique n'ayant pas réagi ; lesdits lavages pouvant être par exemple effectués avec une solution contenant du Tris-HCl 10 mM, NaCl 300 mM et Tween 20 0,1%, pH 7,4.

- révélation des sondes de détection hybridées aux séquences nucléiques amplifiées.

30 Selon un mode avantageux de l'invention, la sonde de détection est marquée à la peroxydase, et la révélation de l'activité de la peroxydase liée à la sonde de détection hybridée est réalisée par lecture colorimétrique, en présence d'un substrat chromogène, selon les étapes suivantes :

- dépôt d'une solution contenant un substrat chromogène, tel que le tetraméthylbenzidine (TMB), dans chacun des puits contenant le mélange de la

réaction, et incubation à l'obscurité de la microplaqué pendant un temps suffisant généralement 20 à 30 min., puis la réaction est arrêtée par l'addition d'une solution d'arrêt, ladite solution étant avantageusement une solution de H_2SO_4 utilisée à une concentration finale de 0.5 N,

5 - détermination de la densité optique, ladite détermination étant réalisée à une longueur d'onde de 450 nm (référence 620 nm) lorsque le TMB est utilisé comme substrat chromogène.

10 Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, la sonde de capture utilisée pour la détection de *E. coli* O157 :H7 peut être SEQ ID N°15 et la sonde de détection est l'oligonucléotide SEQ ID N°18. De même, la sonde de capture utilisée pour la détection des bactéries EHEC peut être SEQ ID N°25 et la sonde de détection l'oligonucléotide SEQ ID N°27.

15 L'invention concerne également une trousse de détection, pour l'identification de *E. coli* O157 :H7 ou des EHEC, contenus dans un échantillon, comprenant parmi les réactifs :

20 - au moins deux oligonucléotides tels que définis précédemment, utilisés comme amorces pour l'amplification de *E. coli* O157 :H7 ou des bactéries du groupe EHEC,

- éventuellement, un composant pour vérifier la séquence du fragment amplifié, plus particulièrement, une sonde nucléique telle que définie précédemment.

25 Les exemples suivants sont donnés à titre non limitatif pour illustrer l'invention.

EXAMPLE 1

Caractérisation des séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2

30 1) Construction de la banque génomique de *E. coli* O157 :H7 :

L'ADN génomique de la souche *E. coli* O157 :H7 isolée des selles d'un patient atteint de colite hémorragique et productrice des vérotoxines de type 1 et 2 a été digéré partiellement par l'endonucléase *PstI* (Boehringer Mannheim ; Réf. 621625) en faisant agir 0.03 unité d'enzyme par μ g d'ADN en milieu tamponné

pendant 1 heure à 37°C. L'ADN génomique ainsi digéré a permis de générer des fragments de 35-45 kb. Le cosmid pHC79 (*Hohn et Murray, Proc. Natl. Acad. Sci 74, 1977, 3259-3263*) a été digéré de la même manière et déphosphorilé pour éviter toute autoligation.

5

La ligation s'est effectuée en mélangeant 900 ng de vecteur et 2.6 µg de fragments d'ADN de 35-45 kb (soit un rapport molaire vecteur/insert de 2), le milieu réactionnel étant laissé à 14°C pendant 18 heures après avoir été additionné de 2 unités de T4 DNA ligase (Boehringer Mannheim ; Réf. 481220).

10

Les cosmides recombinants ont été encapsidés *in vitro* et utilisés pour transformer les bactéries *E. coli* XL1-Blue MR (Stratagene ; Réf. 200300). Les bactéries transformées ont été incubées 1 heure à 37°C en milieu LB (*Luria-Bertani, Molecular Cloning, A practical guide, Sambrook et al., Vol.3, 1989, annexe A1*). Les fragments d'ADN de 35-45 kb étant insérés dans le vecteur pHC79 de manière à abolir le site de résistance ampicilline et préserver le site de résistance tétracycline, les bactéries ont été ensuite étalées sur milieu sélectif gélosé contenant 12.5 µg/ml de tétracycline.

15

Des mini-préparations d'ADN cosmidique ont été effectuées à partir des 20 360 premières colonies isolées sur tétracycline en utilisant le Kit REAL Prep96 distribué par Quiagen (Réf. 26171).

25

L'ADN de ces préparations a été ensuite digéré par les endonucléases *PstI*, *EcoRI* et *Sall* (Boehringer Mannheim, Réf. 621625, 703737 et 567663), analysé en électrophorèse sur gel d'agarose à 1.2 % puis transféré sur filtre de nylon Hybond N⁺ (Amersham, Réf. RPN 303B). L'ADN a été fixé de façon irréversible par 5 mn d'exposition aux UV.

30

2) Criblage de la banque :

Les hybridations ont été réalisées avec une sonde d'ADN homologue provenant de la souche *E. coli* O157 :H7 (Collection de l'Institut Pasteur, n° 103571) et avec une sonde d'ADN hétérologue constituée d'un « pool » d'ADN provenant de 8 souches *E. coli* O55 :H7 (Collection de l'Institut Pasteur, n° 105215, 105216, 105217, 105228, 105239, 105240, 105241, 105242).

Les différents filtres ont été hybridés pendant 16 à 18 heures à 65°C dans une solution contenant du tampon SSC (Sodium Saline Citrate ; *Molecular Cloning, A practical guide, Sambrook et al., Vol. 3, 1989, annexe B13*) 6 fois concentré, de la solution de Denhart 5 fois concentrée (*Molecular Cloning, Vol.3, 1989, annexe B15*), 10 % de sulfate dextran (Pharmacia Biotech, Réf. 17-0340-02), 10 mM EDTA, 0.5 % SDS, 100 µg/ml ADN simple brin de sperme de saumon et l'ADN relevant (O157 :H7).

Après hybridation, les filtres ont été lavés 2 fois 10 mn dans un tampon SSC 2 fois concentré à 65°C, 1 fois 30 mn dans un tampon contenant du SSC 2 fois concentré et 0.1 % SDS à 65°C puis 1 fois 10 mn dans du SSC dilué au 1/10è à 65°C. Les filtres encore humides ont été exposés en cassette avec un écran intensifiant pendant 24 à 48 heures à -80°C.

Après le temps d'exposition nécessaire, les films ont été développés puis les membranes de nylon déshybridées en effectuant 4 à 5 cycles de bains à 45°C sous agitation. Pour chaque cycle, 2 bains successifs de 30 mn dans une solution de NaOH 0.5 N puis 30 mn dans un tampon contenant du SSC dilué au 1/10è et SDS 0.1 % ont été effectués. Les membranes ont finalement été lavées en SSC 2 fois concentré et mises en cassette pour vérifier qu'il ne reste plus de traces d'hybridation. Après déshybridation, les filtres ont été hybridés de la même manière que précédemment avec un pool d'ADN non relevant (O55 :H7).

3) Isolement et clonage des fragments SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2 :

Les résultats de ces hybridations ont permis d'identifier deux clones cosmidiques à partir desquels un fragment d'environ 1 à 2 kb, hybridant avec la sonde homologue et n'hybridant pas avec la sonde hétérologue, a été isolé respectivement. Après avoir vérifié leur conservation chez différentes souches O157 :H7 par hybridation en « dot-blot », ces fragments ont été clonés dans un vecteur pUC18 (Oncor Appligene, Réf. 161131) puis préparés en grande quantité. Les plasmides recombinants ont été dénommés pDF3 et pDF4 et correspondent respectivement aux séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2.

4) Détermination des séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2

Les fragments ont été séquencés selon la méthode de Sanger *et al.* décrite dans *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 1977, 5463, en utilisant le « primer universel » et le « reverse primer » du plasmide pUC18, ainsi que des oligonucléotides internes aux séquences.

La séquence SEQ ID N°1 (Figure 1), contenant 1489 pb, présente une homologie de 99,9 % avec le gène *katP* de *E. coli* O157 :H7 dans la région 407 à 1489 et une homologie de 95,8 % avec l'IS91 de *E. coli* dans la région 1 à 406.

10

L'analyse de la séquence SEQ ID N°2 (Figure 2), contenant 1181 pb, ne révèle aucune séquence connue du plasmide entérohémolytique. Seule la partie 237 à 570 présente une homologie de 68 % avec le gène plasmidique *virK* codant pour une protéine de virulence de *Shigella flexneri*.

15

20

EXEMPLE 2Détection spécifique de *E. coli* O157 :H7

L'étude de spécificité a été effectuée sur 100 souches de *E. coli* de 25 sérotypes différents et 42 souches non *E. coli* comprenant, entre autres, des bactéries susceptibles de présenter des réactions croisées avec *E. coli* O157 :H7 comme par exemple *Salmonella*, *Shigella dysenteriae*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Escherichia hermanii*.

30

1) Extraction de l'ADN :

On obtient les séquences d'ADN par la méthode d'ébullition en présence de Chelex (InstaGene™ Matrix, Biorad). Les échantillons ont été préparés selon le protocole suivant :

Une suspension bactérienne est effectuée dans de l'eau ultra pure stérile à partir de plusieurs colonies bactériennes isolées sur gélose Tryptone-Caséine-Soja (Sanofi Diagnostics Pasteur, Réf. 53455), puis centrifugée à 10000-12000 tours / min pendant 2-3 min et le surnageant soigneusement éliminé. Le culot bactérien est resuspendu dans 200 µl de réactif de lyse, homogénéisé puis incubé dans un bloc chauffant à 100°C pendant 10-15 min. L'échantillon est de nouveau homogénéisé, puis centrifugé à 10000-12000 tours / min pendant 2-3 min. L'ADN peut être amplifié directement ou stocké à -20°C.

10 2) Amplification par PCR :

La réaction d'amplification est réalisée dans un volume total de 50 µl contenant 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 0,01% gélatine; 3 mM MgCl₂; 0,25 µM de chaque amorce SEQ ID N°5 et SEQ ID N°6 ; 100 µM (dATP, dCTP, dGTP) ; 400 µM dUTP ; 0,5 unité d'Uracyl-DNA-Glycosylase (UDG ; BRL Life Technologies) ; 1 unité de Taq DNA Polymérase (BRL Life Technologies) et 5 µl d'ADN préparé comme indiqué dans le paragraphe 1.

Après une incubation à 50°C pendant 2 min puis à 95°C pendant 5 min, les échantillons sont soumis à 35 cycles d'amplification composés de 15 sec à 95°C, 15 sec à 65 °C et 15 sec à 72°C. Les tubes sont maintenus à 72°C jusqu'au retrait du plateau.

Les cycles thermiques sont réalisés dans un thermocycleur « Perkin-Elmer 9600 ».

25 Chaque expérience comprend un contrôle positif et un contrôle négatif.

3) Visualisation des produits amplifiés :

Les réactions d'amplification sont visualisées sur gel d'agarose ou détectées sur microplaqué.

3-1) Gel d'agarose :

30 Après amplification, 50 µl de chloroforme sont ajoutés à chaque échantillon afin d'inactiver l'UDG puis une aliquote de chaque réaction est analysée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2 % coloré au bromure d'éthidium, en présence d'un marqueur de taille. La visualisation d'un fragment d'ADN à 676 pb indique la présence de *E. coli* O157 :H7 dans l'échantillon testé.

3-2) Hybridation en microplaqué :

Les produits d'amplification sont dénaturés par addition volume à volume d'une solution contenant 200 mM NaOH, 40 mM EDTA. La microplaqué dont la surface des puits est revêtue de la sonde de capture SEQ ID N°15 est préhybridée dans un tampon d'hybridation contenant du SSPE 5 fois concentré, 0,5 % Tween 20 et 0,01 % Merthiolate. Puis la microplaqué est vidée et chacune des cupules reçoit 200 µl de tampon d'hybridation contenant le fragment amplifié dénaturé et la sonde de révélation SEQ ID N°18. L'incubation est effectuée à 10 37°C sous agitation pendant 1 heure.

Les cupules sont ensuite lavées six fois avec 400 µl de solution (10 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 300 mM NaCl et 0,1% Tween 20), puis l'activité de la peroxydase liée à la sonde est détectée en ajoutant dans chaque cupule 200 µl d'une solution de détection contenant le chromogène tétraméthylbenzidine (TMB). La microplaqué est incubée à 37°C dans l'obscurité pendant 30 min puis 15 100 µl d'une solution de 1,5 N H₂SO₄ sont ajoutés pour bloquer les réactions. Les densités optiques sont déterminées à 450 nm contre une référence à 620 nm.

4) Etude de la spécificité :

20 Les tests ont été effectués sur un total de 142 souches bactériennes, utilisant le couple d'amorces SEQ ID N°5 et SEQ ID N°6 pour l'étape d'amplification par PCR, la sonde de capture SEQ ID N°15 et la sonde de détection SEQ ID N°18 pour l'étape d'hybridation sur microplaqué.

25 Les résultats obtenus sur microplaqué avec les souches *E. coli* et non *E. coli* (bactéries de genres et espèces différents) sont présentés respectivement dans les Tableaux I et II ci-dessous :

Tableau I

Souche <i>E. coli</i> (sérotype)	Nombre de souches testées	PCR SEQ ID N° 5 / 6
VTEC/EHEC		
O157:H7	55	+
O157:H-	1	+
O26:H11	10	-
O111:H-	2	-
O145:H-	2	-
O103:H2	2	-
O121:H19	1	-
O165:H25	1	-
O45:H2	1	-
O22:H8	2	-
O137:H41	1	-
O91:H21	1	-
O141:H4	1	-
EPEC		
O55:H7	8	-
O55:H6	1	-
O55:H-	1	-
O111:H-	1	-
O111:H2	1	-
O111:H12	1	-
O128:H2	1	-
O127:H6	1	-
ETEC		
O157:H19	1	-
O159:H34	1	-
CIP 81.86	1	-
<i>E. coli</i>		
CIP 76.24	1	-
CIP 54.8	1	-

Les résultats (+) correspondent à $DO_{450} > 2,5$.

Les résultats (-) correspondent à $DO_{450} < 0,05$.

Tableau II

Souche (espèce bactérienne)	Nombre de souches testées	PCR SEQ ID N° 5 / 6
Salmonella		
Salmonella (groupes I à VI)	10	-
Shigella		
Shigella flexneri	2	-
Shigella dysenteriae	1	-
Shigella sonnei	1	-
Autres		
Escherichia hermanii	2	-
Citrobacter freundii	2	-
Yersinia enterocolitica	2	-
Yersinia pseudotuberculosis	1	-
Hafnia alvei	1	-
Proteus mirabilis	1	-
Proteus vulgaris	1	-
Serratia marcescens	1	-
Klebsiella pneumoniae	2	-
Klebsiella oxytoca	1	-
Enterobacter cloacae	1	-
Enterobacter aerogenes	1	-
Enterobacter agglomerans	1	-
Bacillus subtilis	1	-
Morganella morganii	1	-
Providencia alcalifaciens	1	-
Vibrio parahaemolyticus	1	-
Acinetobacter baumanii	1	-
Shewanella putrefaciens	1	-
Pseudomonas aeruginosa	1	-
Pseudomonas fluorescens	1	-
Listeria monocytogenes	3	-

Les résultats (+) correspondent à $DO_{450} > 2,5$.

Les résultats (-) correspondent à $DO_{450} < 0,05$.

En conclusion, seules les souches O157 :H7 et O157 :H- sont détectées sur microplaqué avec le système susmentionné.

EXEMPLE 3Détection spécifique des EHEC

La spécificité a été testée sur un total de 142 souches bactériennes incluant différents sérotypes de *E. coli* ainsi que d'autres espèces bactériennes pouvant interférer avec la détection des EHEC.

Les ADN ont été extraits selon le protocole décrit dans le premier paragraphe de l'exemple 2.

Les conditions d'amplification sont les suivantes :

10 La réaction est réalisée dans un volume total de 50 µl contenant 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 1,5 mM MgCl₂; 0,5 µM de chaque amorce SEQ ID N°21 et SEQ ID N°22 ; 200 µM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ; 1 unité de Taq DNA Polymérase (BRL Life Technologies) et 5 µl d'ADN préparé comme indiqué dans le paragraphe 1 de l'exemple 2.

15

Les cycles thermiques sont réalisés dans un thermocycleur « Perkin-Elmer 9600 ».

Chaque expérience comprend un contrôle positif et un contrôle négatif.

20

Les produits d'amplification ont été visualisés sur gel d'agarose coloré au BET, la présence d'une bande à 382 pb témoignant de la présence d'EHEC dans l'échantillon testé.

Les résultats sont présentés dans le Tableau III.

25

Seules les souches présentant les caractères *ehly* et *eae*, facteurs de virulence fréquemment associés chez les souches isolées d'infections humaines, sont détectées par PCR avec le couple d'amorces SEQ ID N°21 et SEQ ID N°22.

30

De plus, l'utilisation dudit couple d'amorces permet également de détecter en particulier, grâce à une réaction d'amplification unique, les souches de *E. coli* possédant le génotype (*vt*⁺, *eae*⁺ et *ehly*⁺), caractéristique des *E. coli* entérohémorragiques.

Tableau III

Souche (sérotype)	Nombre de souches testées	Génotype	PCR SEQ ID N°21/22
VTEC/EHEC			
O157:H7	54	vt+ , ehly+ , eae+	+
	1	vt- , ehly+ , eae+	+
O157:H-	1	vt+ , ehly+ , eae+	+
O26:H11	5	vt+ , ehly+ , eae+	+
	1	vt- , ehly+ , eae+	+
O26:H-	1	vt+ , ehly+ , eae+	+
O111:H-	1	vt+ , ehly+ , eae+	+
O145:H-	2	vt+ , ehly+ , eae+	+
O103:H2	2	vt+ , ehly+ , eae+	+
O121:H19	1	vt+ , ehly+ , eae+	+
O165:H25	1	vt+ , ehly+ , eae+	+
O45:H2	1	vt+ , ehly+ , eae+	+
O22:H8	2	vt+ , ehly+ , eae-	-
O137:H41	1	vt+ , ehly+ , eae-	-
O91:H21	1	vt+ , ehly+ , eae-	-
O26:H11	3	vt+ , ehly- , eae+	-
O111:H-	1	vt+ , ehly- , eae+	-
O141:H4	1	vt+ , ehly- , eae-	-
EPEC			
O55:H7	8	vt- , ehly- , eae+	-
O55:H6	1	vt- , ehly- , eae-	-
O55:H-	1	vt- , ehly- , eae-	-
O111:H-	1	vt- , ehly- , eae-	-
O111:H2	1	vt- , ehly- , eae+	-
O111:H12	1	vt- , ehly- , eae-	-
O128:H2	1	vt- , ehly- , eae+	-
O127:H6	1	vt- , ehly- , eae+	-
ETEC			
O157:H19	1	vt- , ehly- , eae-	-
O159:H34	1	vt- , ehly- , eae-	-
CIP 81.86	1	vt- , ehly- , eae-	-
E. coli			
CIP 76.24	1	vt- , ehly- , eae-	-
CIP 54.8	1	vt- , ehly- , eae-	-
Non E. coli	42		-

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique isolée comprenant la séquence nucléique SEQ ID N°1 ou la séquence nucléique SEQ ID N°2, leurs séquences complémentaires, les fragments et séquences dérivées de celles-ci, différant par mutation, insertion, délétion et/ou substitution d'une ou plusieurs bases et s'hybridant dans des conditions de forte stringence avec les séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2, respectivement.
10
2. Séquence nucléotidique isolée comprenant la séquence SEQ ID N°1, les séquences complémentaires de celles-ci et les séquences dérivées de celle-ci, comprenant un enchaînement nucléotidique résultant de l'association stable d'au moins une partie de la séquence d'insertion /S91 et au moins une partie de la 15 séquence du gène *katP*.
3. Séquence nucléotidique isolée selon la revendication 2, comprenant au moins 8, avantageusement 10, de préférence 14 nucléotides consécutifs de l'enchaînement de la séquence SEQ ID N°1, incluant les nucléotides de la 20 position 400 à 407.
4. Séquence nucléotidique isolée comprenant au moins 8 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°1 ou de la séquence SEQ ID N°2, ou de séquences complémentaires et dérivées de celles-ci, telles que définies à la 25 revendication 1.
5. Séquence nucléotidique isolée selon la revendication 4, choisie parmi les séquences nucléiques suivantes :
SEQ ID N°3 : 5' - CGGAGATGAAAGCACCCTGTG - 3'
30 SEQ ID N°4 : 5' - GGGCTGTGTAATCTCAGAGGAG - 3'
SEQ ID N°5: 5' - GTCCGGAGATGAAAGCACCCTGTG - 3'
SEQ ID N°6 : 5' - TCAGGGCTGTGTAATCTCAGAGGAG - 3'
SEQ ID N°7 : 5' - GGCGCTGATACCGGCAAGAATGG - 3'

SEQ ID N°8 : 5' - GGTCCCGCAGGCCATGATTTTG - 3'
SEQ ID N°9 : 5' - CCGGCAAGAACGGTCAAGCCGAACTCC - 3'
SEQ ID N°10 : 5' - AAGGGGTTCCAAGCCGCAACTGACGA - 3'
SEQ ID N°11 : 5' - TAAGGGGTTCCAAGCCGCAACTGACG - 3'
5 SEQ ID N°12 : 5' - CTCAACGGCATCGTCAGTTGCGGCTTGAAC - 3'
SEQ ID N°13 : 5' - AGCACTCAACGGCATCGTCAGTTGCGGCTTG - 3'
SEQ ID N°14 : 5' - CTATTCAGGATAACCCTTCGTCAACACG - 3'
SEQ ID N°15 : 5' - AATTCCCTTAATCCGGAGCTATTGTATGA - 3'
SEQ ID N°16 : 5' - GAAGACCAGCTTTTGTTC - 3'
10 SEQ ID N°17 : 5' - TGTCACAGACTCAATGACTA - 3'
SEQ ID N°18 : 5' - GGCATCGTCAGTTG - 3'
SEQ ID N°19 : 5' - CGGCATCGTCAGTTGC - 3'
SEQ ID N°20 : 5' - ACGGCATCGTCAGTTGCG - 3'
SEQ ID N°21 : 5' - CCACCTGAACGATAAGCGGAAC - 3'
15 SEQ ID N°22 : 5' - CACCTTCCTTCCATCCTCAGAC - 3'
SEQ ID N°23 : 5' - ATCCCAGCGCGCTCCAGCTG - 3'
SEQ ID N°24 : 5' - ACCCATGATGGCGCATCTGATG - 3'
SEQ ID N°25 : 5' - ACGTTCTGGTCTTACGGGTGATGTAGGTTT - 3'
SEQ ID N°26 : 5' - TAGTGAAGCGGTGACAGCATATCAGACGGCT - 3'
20 SEQ ID N°27 : 5' - GTGAGATAGGCACAACAATGA - 3'

6. Couples de séquences nucléotidiques isolées selon les revendications 4 ou 5, utilisés comme amorces, choisis parmi des couples suivants de séquences suivantes :

25 - SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 4
- SEQ ID N° 5 et SEQ ID N° 6
- SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 7
- SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 8
- SEQ ID N° 6 et SEQ ID N° 9
30 - SEQ ID N° 21 et SEQ ID N° 22
- SEQ ID N° 23 et SEQ ID N° 24

7. Séquence nucléotidique isolée selon la revendication 4 ou 5, utilisée comme sonde, choisie parmi les séquences suivantes :

SEQ ID N°14, SEQ ID N°25, SEQ ID N°15, SEQ ID N°26, SEQ ID N°18, et SEQ ID N°27

5

8. Séquence nucléotidique isolée selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle est marquée.

9. Séquence nucléotidique isolée selon la revendication 7, caractérisée en 10 ce qu'elle est immobilisée sur un support.

10. Plasmides pDF3 et pDF4 déposés à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes respectivement sous les numéros I-1999 et I-2000, le 26 mars 1998.

15

11. Cellule hôte comprenant un plasmide selon la revendication 10.

12. Procédé de détection de *E. coli* O157:H7 ou des EHEC dans un échantillon, comprenant les étapes suivantes :

20 (a) mise en contact de l'échantillon avec un couple d'amorces oligonucléotiques choisi parmi les oligonucléotides définis à la revendication 5 ; l'acide nucléique contenu dans l'échantillon ayant été, le cas échéant, rendu accessible aux dites amorces à la cible recherchée,

25 (b) amplification de la séquence nucléique encadrée par le couple d'amorces choisi,

(c) vérification de la présence du produit amplifié par utilisation d'au moins une sonde spécifique du produit amplifié.

13. Procédé selon la revendication 12, selon lequel l'étape (c) comprend les 30 sous-étapes suivantes :

(c₁) dénaturation des séquences amplifiées par un moyen physique ou chimique,

5 (c₂) mise en contact avec une solution contenant les fragments amplifiés dénaturés de l'étape (c₁) avec, d'une part, au moins une sonde de capture, et d'autre part, au moins une sonde de détection, éventuellement marquée, les sondes de capture et de détection ayant une séquence telle que définie à la revendication 1, et susceptibles de s'hybrider avec le même brin des fragments amplifiés, ladite mise en contact étant réalisée pendant un temps suffisant pour permettre la réaction d'hybridation,

10 (c₃) au moins un lavage pour éliminer les séquences nucléiques n'ayant pas réagi,

15 (c₄) révélation des sondes de détection hybridées aux séquences nucléiques amplifiées.

14. Procédé selon les revendications 12 ou 13, dans lequel la sonde de capture est fixée à la surface d'un puits d'une plaque de microtitration.

15

15. Procédé selon les revendications 12 ou 13, dans lequel la sonde de détection est marquée à la peroxydase.

20 16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que la mise en évidence de l'activité de la peroxydase liée à la sonde de détection ayant réagi, s'effectue par réaction colorimétrique, en présence d'un substrat chromogène, tel que le tétraméthylbenzidine (TMB), par la mise en œuvre des étapes suivantes :

25 - addition du substrat chromogène, tel qu'une solution de TMB dans les puits contenant le mélange réactionnel,

- incubation, à l'obscurité, pendant un temps suffisant pour permettre le développement de la coloration,

- blocage de la réaction par addition d'une solution d'arrêt,

- détermination de la densité optique à une longueur d'onde appropriée.

30

17. Procédé de détection de *E. coli* O157 :H7, selon l'une quelconque des revendications 12 à 16, mettant en œuvre les oligonucléotides suivants :

- les séquences SEQ ID N°5 et SEQ ID N° 6, comme amorces pour l'amplification,

- la séquence SEQ ID N° 15, comme sonde de capture,

- la séquence SEQ ID N° 18, comme sonde de détection.

5

18. Procédé de détection des EHEC, selon l'une quelconque des revendications 12 à 16, mettant en œuvre les oligonucléotides suivants :

- les séquences SEQ ID N°21 et SEQ ID N° 22, comme amorces pour l'amplification,

10 - la séquence SEQ ID N° 25, comme sonde de capture,

- la séquence SEQ ID N° 27, comme sonde de détection.

19. Trousse pour la détection de *E. coli* O157 :H7 ou des EHEC, comprenant parmi les réactifs :

15 - au moins deux oligonucléotides selon la revendication 5, utilisés comme couple d'amorces,

- éventuellement au moins une sonde oligonucléotidique selon la revendication 5, pour la détection du produit amplifié.

20

1	CTGCAGTCCG	GAGATGAAAG	CACCACTGTG	TGTACCCAT	CAGCGTGGTC
51	CCGCAGGCCA	TGATTTTGT	CACAGACTCA	ATGACTACCG	GACGCCACTGA
101	ACCTTCCGGT	TGTTTCTCCA	GCCAGTTAAG	CCAGCGGTTT	CCCTGCTGAA
151	AAATGTGGC	AAAACGGGGA	AGCATCAGAA	GGGCGGGGGA	ACTCCGTCCG
201	GCCAGTGAAC	CGTGCCACAC	TCCGGGCAGT	ACATGCCGCC	GGCGCTGATA
251	CCGGCAAGAA	TGGTCGAAA	CTCCCCGCTCC	GTGCAGCGGG	CTATTCAGG
301	ATACCCCTCG	TCATCAACAC	GTACAAACCA	GAAGACCAGC	TTTTTGTTC
351	TGACATCCAC	AAAGAAGGGA	ATATTCAAGGT	CTGCGCAGCA	CTCAACGGCA
IS91	TCGTCAGTTG	katP CGGCTGGAA	CCCCTTAGTA	TTTTTGTCT	GTAGTATCTA
401	TCCCAGCAAT	AGGTATATCC	TGTTGCATCA	ATAAAGTTGA	CTTTTGTATA
451	CAACATGCGA	ATTTCCCTTA	ATCCGGAGCT	ATTCGTATGA	TAAAAAAAAC
501	TCTTCCTGTT	CTGATTCTTC	TGGCGCTATC	GGGGAGCTTT	TCTACCGCTG
551	TAGCCGCTGA	TAAAAAAAGAG	ACTCAAAATT	TCTACTATCC	AGAAACACTG
601	GATTAACTC	CTCTGAGATT	ACACAGCCCT	GAATCAAATC	CCTGGGGGGC
651	TGATTTGAT	TATGCCACCA	GATTTCAACA	GCTGGATATG	GAGGCTCTGA
701	AAAAAGATAT	CAAAGATTG	CTGACAACTT	CCCAGGATTG	GTGCCCTGCG
751	GATTATGGTC	ATTATGGTCC	TTTCTTTATT	CGTATGGCTT	GGCACGGTGC
801	CGGAACATAC	AGGACATATG	ATGGCCGGGG	AGGCGCCAGT	GGTGGTCAGC
851	AACGTTTGA	ACCGCTGAAC	AGCTGGCCGG	ATAACGTTAA	TCTGGATAAA
901	GCCCGTCGAT	TGCTGTGGCC	AGTCAAGAAA	AAATACGGCT	CCAGTATTTC
951	CTGGGGAGAC	CTGATGGTCC	TGACTGGTAA	TGTTGCCCTT	GAATCCATGG
1001	GATTAAAAC	GCTGGGATT	GCTGGCGGAA	GAGAAGATGA	CTGGGAGTCG
1051	GACCTGGTAT	ACTGGGGGCC	TGACAAACAAG	CCTCTTGCAG	ATAACCGGGA
1101	TAAAAACGGG	AAACTTCAGA	AACCTCTTGC	CGCCACGCAG	ATGGGACTTA
1151	TTTATGTC	TCCTGAAGGC	CCCGGTGGAA	AACCAGATCC	TCTGGCTTCC
1201	GCGAAAGATA	TCAGGGAAGC	TTTTTCACGT	ATGCCATGG	ATGATGAGGA
1251	GAATGGGCC	CTGATCGCGG	GAGGGCATAC	ATTTGGTAAA	GCACATGGTG
1301	CAGCGTCTCC	TGAAAAATGT	ATTGGCGCAG	GGCCTGATGG	TGCACCTGTG
1351	GAGGAGCAGG	GAATGGGATG	GAAAAATAAA	TGTGGTACAG	GAAACGGCAA
1401	ATATACCATC	ACCAGTGGCC	TGGAAGGAGC	CTGGTCGAC	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1	CTGCAGGAGA	TGGAAAAAAA	GCCAAAATAA	AAAATTGCC	ATCCCAGCGC
51	GCTCCAGCTG	AAAGTAGGCC	TGTTCTGTCC	GGTATTTAAA	TGCATTGACC
101	GTCCCCGTAT	TTAAACAAATG	TGATAAAATTA	CTCCGTTACC	GGAAAACCGC
151	TGAACAAAAT	TCGGGCTGAA	AAGAGGATCC	GCCGTTATCT	GTTGCATTT
201	CCCTTAGCCT	GACTAGCCAG	AGACACAATG	ATCTGTGCCG	TTCTGTTAAT
251	ATCAAACCGG	TACTCAATAT	CTTCTCTGGC	GCTGGCTGCC	ATCATCCGGA
301	AGCGTTCCGG	TCGGGATAAA	AAATCGCGCA	GTGCGCCGGT	CCATGCAGAC
351	ACATCCCCA	CGGGTAACAG	CGTCCCTGTC	ACATTCTTCT	GAATGACATC
401	AGGGATCCCG	CCC GTCTCAC	TGGCGATAAC	GGGCACGCCG	GAGACTGACG
451	CTTCAGCCAG	TACCATACCA	AACGCTTCAT	TTTCCGAAGG	CATGACCACC
501	ACACTGGCAA	TCCGGTAGAC	CGGTAACGCT	GGGAAAAGGG	CACCTGCCAT
551	TAACACATCT	CCGCTCATTC	CCAGGTGTTC	TGTCTGCTGA	CGCAGACGTG
601	CTTCGTATTC	TTCACGCCCG	GCGCCCACCA	CGAGCCAGCG	AAATGATTTC
651	CCTTCCATCT	TCAGCTGATA	CAATACACGC	AGCATAAAATT	CATGTCCTTT
701	TTCGGGACGT	AGCATCCCCA	CCTGAACGAT	AAGCGGAACA	TTGTCTGCTG
751	ATGCAGCCA	GGCGTGGATA	TGCAGGGGTA	ACGGTCGCAT	GGCTTCATTA
801	TGCAATGCGG	GCCAGTCGAA	ACCCGGTGGA	ATAACCGTTA	CCGGTGTCC
851	GACACCTTCC	GCCATCAGAT	GCGCCATCAT	GGGTGAGATA	GGCACAAACAA
901	TGAAATCACA	CAGATAATT	AGGGAAAACG	TTCTGGTCTT	ACGGGTGATG
951	TAGGTTTTTT	GTCTGACAAT	AGTGAAGCGG	TGACAGCATA	TCAGACGGCT
1001	CAGTCCTGCT	ATATTACTGT	CATGCCACT	ATGGCAGATG	ACCAGATCAG
1051	GTAAATTC	CCCGATAATC	CGTCGAAGTC	TGAGGATGGA	AGGAAGGTGA
1101	AGGCTGTTCC	TGAAAGGAAT	AAAAGTGACA	TCATGCCCTC	TTTTCTGGC
1151	TTCCGGAGCA	ATTTTACTTT	TTTCTCTGCA	G	

FIG.2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE

(i) DEPOSANT :

- (A) NOM : PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS
- (B) RUE : 3 BOULEVARD RAYMOND POINCARE
- (C) VILLE : MARNES LA COQUETTE
- (D) PAYS : FRANCE
- (E) CODE POSTAL : 92430

(ii) TITRE DE L'INVENTION : SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES POUR LA DETECTION DES *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRAGIQUES

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES : 27

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°1 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 1489 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : double
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°1 :

1	CTGCAGTCCG	GAGATGAAAG	CACCACTGTG	TGTACCCCAT	CAGCGTGGTC
51	CCGCAGGCCA	TGATTTTGT	CACAGACTCA	ATGACTACCG	GACGCACTGA
101	ACCTTCCGGT	TGTTTCTCCA	GCCAGTTAAG	CCAGCGGTTT	CCCTGCTGAA
151	AAATGTCGGC	AAAACGGGGA	AGCATCAGAA	GGGCAGGGGA	ACTCCGTCCG
201	GCCAGTGAAC	CGTGCCACAC	TCCGGGCAGT	ACATGCCGCC	GGCGCTGATA
251	CCGGCAAGAA	TGGTCGAAA	CTCCCGCTCC	GTGCAGCGGG	CTATTCAGG

THIS PAGE BLANK (USPTO)

301	ATACCCTTCG	TCATCAACAC	GTACAAACCA	GAAGACCAGC	TTTTTGTTC
351	TGACATCCAC	AAAGAAGGGA	ATATTCAAGGT	CTGGCAGCA	CTCAACGGCA
401	TCGTCAGTTG	CGGCTTGGAA	CCCCTTAGTA	TTTTTGTCT	GTAGTATCTA
451	TCCCAGCAAT	AGGTATATCC	TGTTGCATCA	ATAAAAGTTGA	CTTTTGTATA
501	CAACATGCGA	ATTCCCTTA	ATCCGGAGCT	ATTCGTATGA	TAAAAAAAAC
551	TCTTCCTGTT	CTGATTCTTC	TGGCGCTATC	GGGGAGCTTT	TCTACCGCTG
601	TAGCCGCTGA	TAAAAAAAGAG	ACTCAAAATT	TCTACTATCC	AGAAACACTG
651	GATTAACTC	CTCTGAGATT	ACACAGCCCT	GAATCAAATC	CCTGGGGGGC
701	TGATTTTGAT	TATGCCACCA	GATTCAACA	GCTGGATATG	GAGGCTCTGA
751	AAAAAGATAT	CAAAGATTG	CTGACAACTT	CCCAGGATTG	GTGCCCTGCG
801	GATTATGGTC	ATTATGGTCC	TTTCTTTATT	CGTATGGCTT	GGCACGGTGC
851	CGGAACATAC	AGGACATATG	ATGGCCGGGG	AGGGGCCAGT	GGTGGTCAGC
901	AACGTTTGA	ACCGCTGAAC	AGCTGGCCGG	ATAACGTTAA	TCTGGATAAA
951	GCCCGTCGAT	TGCTGTGGCC	AGTCAGGAAA	AAATACGGCT	CCAGTATTTG
1001	CTGGGGAGAC	CTGATGGTCC	TGACTGGTAA	TGTTGCCCTT	GAATCCATGG
1051	GATTAAAAC	GCTGGGATT	GCTGGCGGAA	GAGAAGATGA	CTGGGAGTCG
1101	GACCTGGTAT	ACTGGGGGCC	TGACAACAAG	CCTCTTGCAG	ATAACCAGGA
1151	TAAAAACGGG	AAACTTCAGA	AACCTCTTGC	CGCCACGCAG	ATGGGACTTA
1201	TTTATGTCAA	TCCTGAAGGC	CCCGGTGGAA	AACCAGATCC	TCTGGCTTCC
1251	GCGAAAGATA	TCAGGGAAAGC	TTTTCACGT	ATGGCCATGG	ATGATGAGGA
1301	GACTGTGGCC	CTGATCGCGG	GAGGGCATAAC	ATTTGGTAAA	GCACATGGTG
1351	CAGCGTCTCC	TGAAAAATGT	ATTGGCGCAG	GGCCTGATGG	TGCACCTGTG
1401	GAGGAGCAGG	GACTGGGATG	GAAAAATAAA	TGTGGTACAG	GAAACGGCAA
1451	ATATACCATC	ACCAAGTGGCC	TGGAAGGAGC	CTGGTCGAC	

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°2 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 1181 paires de bases**
- (B) TYPE : acide nucléique**
- (C) NOMBRE DE BRINS : double**
- (D) CONFIGURATION : linéaire**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°2 :

1 CTGCAGGAGA TGGAAAAAAA GCCAAAATAA AAAATTGCCC ATCCCAGCGC
51 GCTCCAGCTG AAAGTAGGCC TGTTCTGTCC GGTATTTAAA TGCATTGACC
101 GTCCCCGTAT TTAAACAAATG TGATAAAATTA CTCCGTTACC GGAAAACCGC
151 TGAACAAAAT TCAGGGCTGAA AAGAGGGATCC GCCGTTATCT GTTGCATTTC
201 CCCTTAGCCT GACTAGCCAG AGACACAATG ATCTGTGCCG TTCTGTTAAT
251 ATCAAACCGG TACTCAATAT CTTCTCTGGC GCTGGCTGCC ATCATCCGGA
301 AGCGTTCCGG TCAGGGATAAA AAATCGCGCA GTGCGCCGGT CCATGCAGAC
351 ACATCCCCCA CGGGTAACAG CGTCCCTGTC ACATTCTTCT GAATGACATC
401 AGGGATCCCG CCCGTCTCAC TGGCGATAAAC GGGCACGCCG GAGACTGACG
451 CTTCAGCCAG TACCATAACCA AACGCTTCAT TTTCCGAAGG CATGACCACC
501 ACACGGCAA TCCGGTAGAC CGGTAACGCT GGGAAAAGGG CACCTGCCAT
551 ~~CTAACATATCC~~ ~~CTCGATGATCG~~ ~~GCAGGGATTA~~ ~~CGAGTGAGGA~~ ~~AAATGACCGT~~

651 CCTTCCATCT TCAGCTGATA CAATACACGC AGCATAAATT CATGTCCTT
701 TTCGGGACGT AGCATCCCCA CCTGAACGAT AAGCGGAACA TTGTCTGCTG
751 ATGCAGCCCA GGCGTGGATA TGCAGGGGTA ACGGTCGCAT GGCTTCATTA
801 TGCAATGCGG GCCAGTCGAA ACCCGGTGGA ATAACCCTTA CCGGTGTCCT
851 GACACCTTCC GCCATCAGAT GCGCCATCAT GGGTGAGATA GGCACAAACAA
901 TGAAATCACA CAGATAATTG AGGGAAAACG TTCTGGTCTT ACGGGTGATG
951 TAGGTTTTT GTCTGACAAT AGTGAAGCGG TGACAGCATA TCAGACGGCT
1001 CAGTCCTGCT ATATTACTGT CATGGCCACT ATGGCAGATG ACCAGATCAG
1051 GTTTAAATTC CCCGATAATC CGTCGAAGTC TGAGGATGGA AGGAAGGTGA
1101 AGGCTGTTCC TGAAAGGAAT AAAAGTGACA TCATGCCCTC TTTTCTGGC
1151 TTCCGGAGCA ATTTACTTT TTTCTCTGCA G

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°3 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 22 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°3 :

CGGAGATGAAAGCACCACTGTG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°4 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 22 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : antisens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°4 :

GGGCTGTGTAATCTCAGAGGAG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°5 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 25 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°5 :

GTCCGGAGATGAAAGCACCACGTG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°6 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 25 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : antisens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°6 :

TCAGGGCTGTGTAATCTCAGAGGAG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°7 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 23 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°7 :

GGCGCTGATAACCGGCAAGAATGG

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°8 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 23 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°8 :

GGTCCCGCAGGCCATGATTTTG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°9 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 24 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°9 :

CCGGCAAGAATGGTCGCAAATCC

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°10 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 26 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(E) BRIN : antisens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°10 :

AAGGGGTTCCAAGCCGCAACTGACGA

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°11 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 26 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : antisens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°11 :

TAAGGGGTTCCAAGCCGCAACTGACG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°12 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 31 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°12 :

CTCAACGGCATCGTCAGTTGCGGCTTGGAAC

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°13 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 31 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°13 :

AGCACTAACGGCATCGTCAGTTGCGGGTTG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°14 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 31 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°14 :

CTATTCAGGATAACCCTCGTCATAACACG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°15 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 31 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(D) CONFIGURATION : linéaire

(E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°15 :

AATTCCTTAATCCGGAGCTATCGTATGA

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°16 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 20 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : simple

(D) CONFIGURATION : linéaire

(E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°16 :

GA~~A~~GACCAGCTTTGTTTC

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°17 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

(A) LONGUEUR : 20 paires de bases

(B) TYPE : acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS : simple

(D) CONFIGURATION : linéaire

(E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°17 :

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TGTCACAGACTCAATGACTA

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°18 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 14 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°18 :

GGCATCGTCAGTTG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°19 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 16 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°19 :

CGGCATCGTCAGTTGC

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°20 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 18 paires de bases

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°20 :

ACGGCATCGTCAGTTGCG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°21 :

- (i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :
 - (A) LONGUEUR : 22 paires de bases
 - (B) TYPE : acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS : simple
 - (D) CONFIGURATION : linéaire
 - (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°21 :

CCACCTGAACGATAAGCGAAC

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°22 :

- (i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :
 - (A) LONGUEUR : 22 paires de bases
 - (B) TYPE : acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS : simple
 - (D) CONFIGURATION : linéaire
 - (E) BRIN : antisens

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°22 :
CACCTTCCTCCATCCTCAGAC

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°23 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 20 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°23 :
ATCCCAGCGCGCTCCAGCTG

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°24 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 22 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : antisens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°24 :
ACCCATGATGGCGCATCTGATG

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°25 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 31 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°25 :

ACGTTCTGGTCTTACGGGTGATGTAGGTTT

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°26 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 31 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°26 :

TAGTGAAGCGGTGACAGCATATCAGACGGCT

(2) INFORMATION POUR LA SEQUENCE ID N°27 :

(i) CARACTERISTIQUE DE LA SEQUENCE :

- (A) LONGUEUR : 21 paires de bases
- (B) TYPE : acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS : simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire
- (E) BRIN : sens

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADN (génomique)

(iii) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE : SEQ ID N°27 :

GTGAGATAGGCACAAACAATGA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01000

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N9/08 C12Q1/68 C07K14/245 C12N15/31

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MAKINO K ET AL.: "Complete nucleotide sequence of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 derived from Sakai outbreak" DNA RESEARCH, vol. 5, no. 1, 28 February 1998 (1998-02-28), pages 1-9, XP002091199 TOKYO JP cited in the application the whole document ---- -/-	1-4

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 October 1999	02/11/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer De Kok, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT/FR 99/01000

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRUNDER W. ET AL.: "KatP, a novel catalase-peroxydase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7" MICROBIOLOGY, vol. 142, no. 11, November 1996 (1996-11), pages 3305-3315, XP002091200 GB Y the whole document, in particular pages 3312-3313 ---	1-5 6-9, 12-19
Y	FRATAMICO P M ET AL: "DETECTION OF ESCHERICHIA COLI O157:H7 BY MULTIPLEX PCR" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 33, no. 8, August 1995 (1995-08), pages 2188-2191, XP000197544 US the whole document ---	6-9, 12-19
A	WO 97 32043 A (E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 4 September 1997 (1997-09-04) the whole document ---	12-19
A	US 5 738 995 A (COOMBS JANA ET AL) 14 April 1998 (1998-04-14) column 23, line 1 -column 26, line 37 ---	12-19
A	US 5 475 098 A (HALL ROBERT H ET AL) 12 December 1995 (1995-12-12) the whole document ---	12-19
A	CA 2 078 716 A (MOUNT SINAI HOSPITAL CORP) 22 March 1994 (1994-03-22) the whole document ---	1-19
A	BEEBAKHEE G ET AL: "CLONING AND NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE EAE GENE HOMOLOGUE FROM ENTEROHEMORRHAGIC ESCHERICHIA COLI SEROTYPE O157:H7" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 91, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 63-68, XP002040899 AMSTERDAM NL ISSN: 0378-1097 the whole document -----	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 99/01000

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 9732043	A 04-09-1997	US	5747257 A		05-05-1998
		AU	2135497 A		16-09-1997
		CA	2246259 A		04-09-1997
		EP	0885310 A		23-12-1998
US 5738995	A 14-04-1998	US	5612473 A		18-03-1997
		EP	0785279 A		23-07-1997
		JP	9313181 A		09-12-1997
		US	5753444 A		19-05-1998
		US	5756701 A		26-05-1998
		US	5846783 A		08-12-1998
US 5475098	A 12-12-1995	AU	2965695 A		05-01-1996
		WO	9534682 A		21-12-1995
		US	5756293 A		26-05-1998
CA 2078716	A 22-03-1994	NONE			

This Page Blank (uspto)

This Page Blank (uspto)

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 9/08, C12Q 1/68, C07K 14/245, C12N 15/31		A3	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/55908 (43) Date de publication internationale: 4 novembre 1999 (04.11.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01000</p> <p>(22) Date de dépôt international: 27 avril 1999 (27.04.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/05329 28 avril 1998 (28.04.98) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS [FR/FR]; 3, boulevard Raymond Poincaré, F-92430 Marnes la Coquette (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): FRECHON, Dominique, Thérèse, Marie [FR/FR]; 22, avenue de Saint Ouen, F-75018 Paris (FR). LAURE, Françoise, Claudine [FR/FR]; 6, rue des Couronnes, F-75020 Paris (FR). THIERRY, Dominique [FR/FR]; 4, rue des Longs Prés, F-92100 Boulogne (FR).</p> <p>(74) Mandataire: OBOLENSKY, Michel; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</p> <p>(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 29 décembre 1999 (29.12.99)</p>	
<p>(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES FOR DETECTING ENTEROHEMORRHAGIC <i>ESCHERICHIA COLI</i> (EHEC)</p> <p>(54) Titre: SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES POUR LA DETECTION DES <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROHEMORRAGIQUES (EHEC)</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns nucleic sequences of plasmid origin, present in bacteria of the group enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EHEC), the use of said sequences for searching for EHEC, in particular those having genes coding for enterohemolysin and intimin virulence factors, and more particularly for specific detection of the O157:H7 serotype. The invention also concerns a method using said sequences and detection kits containing them.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention a pour objet des séquences nucléiques d'origine plasmidique, présentes chez les bactéries du groupe <i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques (EHEC), l'utilisation desdites séquences pour la recherche des EHEC, notamment ceux possédant les gènes codant pour les facteurs de virulence entérohémolysine et intimine, et plus particulièrement la détection spécifique du sérotype O157:H7. L'invention vise également un procédé mettant en oeuvre lesdites séquences ainsi que les trousseaux de détection les contenant.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yugoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun			PT	Portugal		
CN	Chine	KR	République de Corée	RO	Roumanie		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SE	Suède		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapour		
EE	Estonie	LR	Libéria				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/01000

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N9/08 C12Q1/68 C07K14/245 C12N15/31

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MAKINO K ET AL.: "Complete nucleotide sequence of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 derived from Sakai outbreak" DNA RESEARCH, vol. 5, no. 1, 28 February 1998 (1998-02-28), pages 1-9, XP002091199 TOKYO JP cited in the application the whole document ---- -/-	1-4

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 October 1999

Date of mailing of the international search report

02/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01000

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRUNDER W. ET AL.: "KatP, a novel catalase-peroxydase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7" MICROBIOLOGY, vol. 142, no. 11, November 1996 (1996-11), pages 3305-3315, XP002091200 GB	1-5
Y	the whole document, in particular pages 3312-3313	6-9, 12-19
Y	FRATAMICO P M ET AL: "DETECTION OF ESCHERICHIA COLI O157:H7 BY MULTIPLEX PCR" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 33, no. 8, August 1995 (1995-08), pages 2188-2191, XP000197544 US the whole document	6-9, 12-19
A	WO 97 32043 A (E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 4 September 1997 (1997-09-04) the whole document	12-19
A	US 5 738 995 A (COOMBS JANA ET AL) 14 April 1998 (1998-04-14) column 23, line 1 -column 26, line 37	12-19
A	US 5 475 098 A (HALL ROBERT H ET AL) 12 December 1995 (1995-12-12) the whole document	12-19
A	CA 2 078 716 A (MOUNT SINAI HOSPITAL CORP) 22 March 1994 (1994-03-22) the whole document	1-19
A	BEEBAKHEE G ET AL: "CLONING AND NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE EAE GENE HOMOLOGUE FROM ENTEROHEMORRHAGIC ESCHERICHIA COLI SEROTYPE O157:H7" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 91, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 63-68, XP002040899 AMSTERDAM NL ISSN: 0378-1097 the whole document	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01000

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9732043	A 04-09-1997	US 5747257 A		05-05-1998
		AU 2135497 A		16-09-1997
		CA 2246259 A		04-09-1997
		EP 0885310 A		23-12-1998
US 5738995	A 14-04-1998	US 5612473 A		18-03-1997
		EP 0785279 A		23-07-1997
		JP 9313181 A		09-12-1997
		US 5753444 A		19-05-1998
		US 5756701 A		26-05-1998
		US 5846783 A		08-12-1998
US 5475098	A 12-12-1995	AU 2965695 A		05-01-1996
		WO 9534682 A		21-12-1995
		US 5756293 A		26-05-1998
CA 2078716	A 22-03-1994	NONE		

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem → Internationale No

PCT/FR 99/01000

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 6 C12N9/08 C1201/68 C07K14/245 C12N15/31

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
 CIB 6 C12N C07K C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>MAKINO K ET AL.: "Complete nucleotide sequence of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O157:H7 derived from Sakai outbreak" <i>DNA RESEARCH</i>, vol. 5, no. 1, 28 février 1998 (1998-02-28), pages 1-9, XP002091199 TOKYO JP cité dans la demande le document en entier --- ---</p>	1-4

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "a" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 octobre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02/11/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

De Kok, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 99/01000

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BRUNDER W. ET AL.: "KatP, a novel catalase-peroxydase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic Escherichia coli 0157:H7" MICROBIOLOGY, vol. 142, no. 11, novembre 1996 (1996-11), pages 3305-3315, XP002091200 GB * le document en entier, particulièrement pages 3312-3313	1-5 6-9, 12-19
Y	FRATAMICO P M ET AL: "DETECTION OF ESCHERICHIA COLI 0157:H7 BY MULTIPLEX PCR" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 33, no. 8, août 1995 (1995-08), pages 2188-2191, XP000197544 US le document en entier	6-9, 12-19
A	WO 97 32043 A (E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 4 septembre 1997 (1997-09-04) le document en entier	12-19
A	US 5 738 995 A (COOMBS JANA ET AL) 14 avril 1998 (1998-04-14) colonne 23, ligne 1 -colonne 26, ligne 37	12-19
A	US 5 475 098 A (HALL ROBERT H ET AL) 12 décembre 1995 (1995-12-12) le document en entier	12-19
A	CA 2 078 716 A (MOUNT SINAI HOSPITAL CORP) 22 mars 1994 (1994-03-22) le document en entier	1-19
A	BEEBAKHEE G ET AL: "CLONING AND NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE EAE GENE HOMOLOGUE FROM ENTEROHEMORRHAGIC ESCHERICHIA COLI SEROTYPE 0157:H7" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 91, 1 janvier 1992 (1992-01-01), pages 63-68, XP002040899 AMSTERDAM NL ISSN: 0378-1097 le document en entier	1-19

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à l'ensemble des membres de familles de brevets

Document International No

PCT/FR 99/01000

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
WO 9732043 A	04-09-1997	US	5747257 A		05-05-1998
		AU	2135497 A		16-09-1997
		CA	2246259 A		04-09-1997
		EP	0885310 A		23-12-1998
US 5738995 A	14-04-1998	US	5612473 A		18-03-1997
		EP	0785279 A		23-07-1997
		JP	9313181 A		09-12-1997
		US	5753444 A		19-05-1998
		US	5756701 A		26-05-1998
		US	5846783 A		08-12-1998
US 5475098 A	12-12-1995	AU	2965695 A		05-01-1996
		WO	9534682 A		21-12-1995
		US	5756293 A		26-05-1998
CA 2078716 A	22-03-1994	AUCUN			

THIS PAGE BLANK (USPTO)